

**Propriétés hémagglutinantes du « virus »
de l'avortement enzootique des petits ruminants
(souches de « Rakeia » d'origine ovine et caprine).**

Note préliminaire

par MM. P. FAYE, A. CHARTON, C. MAGE,
C. BERNARD et C. LE LAYEC

La propriété d'hémagglutination, dans des conditions expérimentales assez étroitement définies (température, pH, absence d'ions Ca et Mg par exemple) que possèdent, vis-à-vis des érythrocytes de souris, divers microorganismes du groupe de la psittacose a été mise en évidence à plusieurs reprises : pour le virus de la méningopneumonie de la souris (HILLEMANN et coll., 1951) ; le virus de la pneumonie féline (GOGOLAK, 1954) ; les virus de l'ornithose et de la psittacose (INABA et coll., 1957). Cette hémagglutination est inhibée par les anticorps spécifiques et cette dernière propriété a été utilisée, dans le diagnostic sérologique de l'ornithose et de la psittacose, chez l'Homme (MATUMOTO et coll., 1960. HENNEBERG et JORDANSKI, 1965). Dans les mêmes conditions expérimentales les résultats seraient négatifs, par contre, avec des virus voisins isolés de mammifères (encéphalite sporadique bovine, pneumonie caprine, pneumonie ovine) : cela ne signifie pas, pour autant, que ces mêmes virus ne soient pas hémagglutinants, dans d'autres conditions expérimentales ; c'est sur cette hypothèse qu'est basé le présent travail, relatif au virus de l'avortement enzootique des petits ruminants.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

— Les souches de Rakeia utilisées (AB 6, AB 7, AB 8, isolées de placentas de brebis avortées ; AC 1 isolée d'un placenta de chèvre avortée (FAYE et coll., 1971) sont entretenues par passages en série sur œuf embryonné.

— L'antigène hémagglutinant est préparé selon les temps

suivants : Broyage au sable des membranes infectées. Mise en suspension en eau bidistillée. Extraction des corps élémentaires par séparation en milieux non miscibles. Purification préliminaire et concentration par centrifugation différentielle. Gel-filtration sur sépharose 2B. Concentration par ultracentrifugation et reprise des corps élémentaires en tampon salé boraté pH 9. Dispersion et rupture partielle des corps élémentaires par traitement rapide (cinq minutes) aux ultra-sons. Cet antigène est conservé à $+ 4^{\circ}$. Les dilutions sont effectuées en tampon salé boraté pH 9.

— Les hématies (Homme O RH +, souris, cobaye, mouton, poussin d'un jour, poulet, oie) sont récoltées en solution citratée, lavées au moins quatre fois en solution isotonique Dextrose-gélatine-véronal et conservées, en suspension à 10 p. 100 en solution d'Alsever, vingt-quatre heures avant emploi. Pour les tests d'hémagglutination, dont chacun est effectué à 4° , 23° et 37° , la réaction s'effectue, parallèlement, aux divers pH, échelonnés de 0,2 en 0,2 unité pH, de 5,6 à 7,4. Les suspensions d'hématies sont préparées au dernier moment, par dilution (1/20 de la suspension précédente), dans les tampons de CLARK et CASALS susceptibles de donner, à chaque température et pour chaque dilution d'antigène, la gamme des pH ci-dessus.

— Dans les tests d'inhibition de l'hémagglutination, les sérums sont traités, selon une méthode classique, par précipitation au kaolin en tampon pH 9, centrifugation et élimination des hémagglutinines non spécifiques par 30 minutes de contact, à 37° , avec les érythrocytes utilisés, puis nouvelle centrifugation : le surnageant (dilution initiale 1/10 en tampon pH 9) est dilué de 0,5 en 0,5 jusqu'au 1/2560. Les réactions d'inhibition mettent en présence, avant addition des hématies, chaque dilution de sérum et quatre unités hémagglutinantes, sous volume égal. La suspension d'hématies est préparée dans le tampon dont le pH correspond à la définition de l'unité hémagglutinante.

— Tous les tests (hémagglutination et inhibition de l'hémagglutination) sont effectués en plaques « Microtest » de 90×120 mm comportant 96 cupules à fond hémisphérique ; les réactifs sont distribués à la pipette de Duclaux. Chaque cupule contient donc : dans la réaction d'hémagglutination, I goutte d'antigène, I goutte de tampon salé boraté, II gouttes de suspension d'hématies à 1/200 ; dans la réaction d'inhibition : I goutte d'antigène (4 unités hémagglutinantes), I goutte de sérum (dilutions échelonnées), II gouttes de suspension d'hématies dans le tampon correspondant à la définition de

l'unité hémagglutinante ; dans les témoins sérums, témoins antigènes, témoins hématies, une ou deux gouttes de tampon remplacent, selon le cas, antigène, sérum, ou antigène et sérum. La lecture s'effectue dès que la sédimentation des témoins est terminée (en moyenne 1 heure 30 à 2 heures).

RÉSULTATS

— Aucune réaction d'hémagglutination ne s'observe en présence des hématies d'Homme O RH⁺, de cobaye, de mouton, de poulet. Les résultats sont difficilement lisibles en présence d'hématies de poussin d'un jour (ils sont nettement négatifs dès la dilution d'antigène 1/4). En présence d'hématies de souris, ce n'est qu'à pH 7 qu'une réaction s'observe, mais à des titres faibles (inférieurs au 1/16) et, de plus, la lecture est aléatoire : la sédimentation des « témoins hématies » est nettement liée à la variation de pH du milieu.

— Par contre, l'hémagglutination des érythrocytes d'oie est positive à des titres qui peuvent atteindre, selon les lots d'antigène, 1/128. Ces titres varient de 1/8 à 1/128 selon le pH. Dans l'ensemble, c'est à pH 6 que s'observent les titres les plus élevés. La réaction est plus rapide, plus nette à 23° qu'à 4° et à 37°. Le titre limite est, de plus, décalé d'une dilution au moins à 23° par rapport aux titres limites notés à + 4° et à 37°. Il n'y a pas élution spontanée.

— Plusieurs sérums, testés antérieurement par d'autres méthodes sérologiques, positifs à des titres variant (en immunofluorescence indirecte) de 1/40 à 1/640 inhibent l'hémagglutination à des titres au moins égaux ou, le plus souvent, supérieurs.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Quelle que soit la nature intime du phénomène observé, qui fera d'ailleurs l'objet d'études ultérieures, le fait que des suspensions purifiées de « Rakeia », dispersées et partiellement désagrégées par le traitement aux ultra-sons provoquent l'hémagglutination des érythrocytes d'oie, a paru mériter d'être rapporté. Il est curieux que ce microorganisme se comporte à la manière d'un arbovirus (hémagglutination à la température du laboratoire, à pH acide, sans élution spontanée, presque exclusivement manifestée vis-à-vis des érythrocytes de l'oie).

— Il est peu probable que la spécificité de la réaction dépasse celle de l'espèce : on sait que, pour la psittacose et la pneumonie féline, l'inhibition de l'héماغglutination décèle le même anticorps que la fixation de complément, et que cet anticorps est identique pour les deux virus.

— Il sera, très probablement, utile de comparer les résultats obtenus par cette méthode et ceux que fournissent les autres méthodes sérologiques (déviatiون du complément, micro-agglutination sur lame, immunofluorescence, par exemple) généralement appliquées au diagnostic des infections à Rakeia : on sait que la réaction d'inhibition de l'héماغglutination est aisée, qu'elle constitue une méthode de choix dès que l'on a à résoudre un problème de diagnostic de troupeau ou d'enquête épizootologique — le seul « facteur limitant » serait l'obligation de disposer, au laboratoire, au moment voulu, d'hématies d'oie de 24 heures au moins et d'une semaine au plus.

RÉSUMÉ

— Un antigène purifié, préparé à partir de souches de « Rakeia » d'origine ovine et caprine entretenues en ovoculture, héماغglutine à pH 6, à 23°, sans élution spontanée, les érythrocytes de l'oie, non ceux d'Homme, de souris, de cobaye, de poussin d'un jour et de poulet.

— Cette héماغglutination est inhibée par les antisérums spécifiques, à des titres analogues à ceux que l'on peut mesurer, dans les mêmes sérums, par d'autres réactions sérologiques (par exemple l'immunofluorescence).

BIBLIOGRAPHIE

- HILLEMAN (M. R.), HAIG (D. A.), HELMOLD (R. J.), 1951. — The indirect complement fixation, hemagglutination and conglutinating complement absorption tests for viruses of the psittacosis lymphogranuloma venereum group. *J. immunol.*, **66**, 115-130.
- GOGOLAK (F.), 1954. — The mouse erythrocyte hemagglutinin of feline pneumonitis virus. *J. Infect. Dis.*, **95**, 220-225.
- INABA (Y.), OMORI (T.), ISHII (S.), MATUMOTO (M.), 1957. — Miyagawanella : psittacosis lymphogranuloma group of viruses 3 : Hemagglutination of psittacosis virus. *Jap. J. Exp. Med.*, **27**, 425-442.

- MATUMOTO (M.), GOTO (T.), NAKAMURA (H.), MATSUSHIMA (S.), NAITO (H.), SHIODA (H.), OMORI (T.), 1960. — Psittacosis in Japan : Analysis of patients with primary atypical pneumonia, acute bronchitis and other diseases by means of complement fixation and hemagglutination inhibition tests. *Jap. J. Exp. Med.*, **30**, 327-348.
- HENNEBERG (G.), JORDANSKI (H.), 1965. — Hemagglutinations Hemmtest (HAH) zur diagnose der Ornithose-Psittacose. *Zbl. Bakteriол. Parasitknde. Krankh. Hyg. J. (Dtsch.)*, **197**, 432-437.
- FAYE (P.), LECOANET (J.), CHARTON (A.), DELAHAYE (J.), LE LAYEC (C.), 1971. — Avortement enzootique « à virus » de la Chèvre. *Bull. Acad. Vét.*, **34**, 61-64.
-